

证 明

REC'D 09 JAN 2003

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2001 11 30

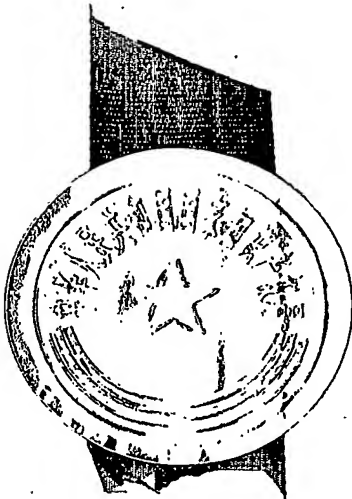
申 请 号： 01 1 39831.0

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置

申 请 人： 清华大学；北京博奥生物芯片有限责任公司

发明人或设计人： 刘鹏；邢婉丽；梁冬；程京



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2002 年 12 月 10 日

Best Available Copy

权利要求书

1、一种检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，含有电泳芯片，其特征在于，它含有：具有微流体通道和加样用电极孔结构的上层通道层，封闭上层微流体通道以构成起完整毛细管且为电泳芯片提供所需电压的中层电极层以及为电泳提供稳定温度梯度的加热层，其中，上、中、下三层是可导热且相互粘合的。

2、根据权利要求1所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的微流体通道是一维、或二维、或多维微流体通道中的任何一种。

3、根据权利要求1所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的微流体通道的截面宽度或直径在 $5-200\mu\text{m}$ 之间，微流体通道的深度在 $5-200\mu\text{m}$ 之间，电泳分离通道的长度在 $1-30\text{cm}$ 之间。

4、根据权利要求1所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述中层电极层的材料是金或铂或石墨中的任何一种。

5、根据权利要求1所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的中层电极层的上表面涂布着一层聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。

6、根据权利要求1所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的加热层带有相间隔地分成二组或多组且各自分别保持不同的恒定温度以便形成稳定的空间温度梯度的温控元件。

7、根据权利要求1所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述加热层的稳定温度梯度是一种把芯片整体均匀逐渐升温而形成的时间温度梯度。

说明书

检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置

技术领域

一种检测核苷酸和单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism 简称 SNP)用的毛细管电泳芯片装置属于毛细管电泳芯片装置技术领域。

背景技术

在基因组中普遍存在着核苷酸和单核苷酸多态性(SNP), 据估计人类基因组中有 300 万个 SNP 位点。SNP 位点在基因组中数量巨大、分布频密且有二态性, 这些性质决定了它成为第三代遗传标记。寻找和研究 SNP 是人类基因组计划的重要内容和目标之一。作为多态性标记, SNP 在人类学、医疗诊断、疾病研究、环境易感因子研究、药物筛选以及法医鉴定等方面具有重大意义。对脱氧核糖核酸(DNA)直接测序是检测 SNP 的最直接的方法, 但其工作量大, 效率低。目前人们致力于寻找高通量的方法。基于 DNA 解链动力学的检测方法就是一类高通量的方法, 它包括梯度变性胶电泳、恒变性胶电泳、毛细管变性胶电泳和变性高效液相层析。但是在这些方法中都要加入变性剂, 而变性剂对电泳、色谱等的影响机制比较复杂, 变性剂的选择, 电泳或色谱条件的设置以及梯度的实现等都是比较大的技术难题。

发明内容

本发明的目的是提供一种基于高速、高效、消耗样品少的毛细管电泳之上的以温度来替代变性剂的检测核苷酸和单核苷酸多态性使用的毛细管电泳芯片装置。

本发明的特征在于, 它含有: 具有微流体通道和加样用电极孔结构的上层通道层, 封闭上层微流体通道以构筑起完整毛细管且为电泳芯片提供所需电压的中层电极层以及为电泳提供稳定温度梯度的加热层, 其中, 上、中、下三层是可导热且相互粘合的。所述的微流体通道是一维、或二维、或多维微流体通道中的任何一种。所述的微流体通道的截面宽度或直径在 $5-200\mu\text{m}$ 之间, 微流体通道的深度在 $5-200\mu\text{m}$ 之间, 电泳分离通道的长度在 $1-30\text{cm}$ 之间。所述的中层电极层的材料是金或铂或石墨中的任何一种。所述的中层电极层的上表面涂布着一层聚二甲基硅氧烷(PDMS)。所述的加热层带有相间隔地分成二组或多组且各自分别保持不相同的恒定温度以便形成稳定的空间温度梯度的温控元件。所述加热层的稳定温度梯度是一种把芯片整体均匀逐渐升温而形成的时间温度梯度。

使用证明: 它可达到预期目的。

附图说明

图 1. 本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置的原理示意图。

图 2. 本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置的上层通道层的俯视示意

图。

图 3. 本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置的中层电极层的俯视示意图。

图 4. 本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置的下层加热层的俯视示意图。

图 5. 本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置中图 1 A—A 向的纵剖视图。

图 6. 图 2 中虚线框的俯视放大示意图。

图 7. 本发明优选实施例装置所用样品的预处理过程示意图。

具体实施方式

请见图 1—图 6。图 1 是图 2、图 3 上、下层叠后的原理示意图。1 是电极孔，2 是第一维电泳分离通道。3 是第二维电泳分离通道，它共有 50 条，每条管宽 $100\mu\text{m}$ ，间距 $100\mu\text{m}$ ，深为 $10\mu\text{m}$ ，电泳分离通道的总长度为 30cm，与电极孔 1 的连接管道宽 $20\mu\text{m}$ ，4 是上层流体通道层，即通道层。本优选实施例装置中，通道层 4 用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 制成，也可以用其他硅橡胶、塑料、石英和玻璃中的任何一种，其电泳分离通道和加样用电极孔 1 的微加工方法有浇铸、模压、蚀刻或光刻，随通道层材料而异。通道层 4 上的电泳分离通道即微流体通道的横截面呈矩形，也可以是任何其他几何形状。上述电泳分离通道是开放的毛细槽，用一片盖片把毛细槽封闭就形成完整的毛细管。同样，贯穿电泳分离通道的通道层也要加盖片才形成完整的液池结构。5 是在中层电极层 6 上的电极。电极层 6 可以封闭上层电泳分离通道以形成完整毛细管又带有为电泳提供所需电压的电极。从图 1 中可知：电极 5 的裸露部分只在必要处与电泳分离通道中的流体接触，提供所需电压，并能根据计算机控制按程序变换电压。电极层 6 可以通过在玻璃上沉积金属再蚀刻而成。金属层采用金，也可用铂或石墨中的任何一种，在金属层上利用氧化方法形成绝缘层，只在与通道层 4 上电极孔 1 对应位置把金属电极暴露出来，或者直接涂布 PDMS 层，只在电极孔 1 的位置裸露金属电极。当通道层 4 与电极层 6 粘合后，电极孔 1 中的溶液与电极层 6 形成的孔底暴露出的电极接触。这些暴露的电极作为电泳提供电泳所需电压。电极 5 也可设计成针状，从通道层 4 上面插入电极孔 1 中与溶液接触，再沿着电泳分离通道对溶液起作用。加热层有加热和冷却两组温控元件。加热元件 7 保持较高的恒定温度，冷却元件 8 保持较低的恒定温度，两者间热量通过电极层 6 的材料玻璃传导，从而在玻璃中形成稳定的空间温度梯度。本实施例中加热和冷却元件用半导体温控元件，也可用电阻。图 6 是图 2 中虚线框的俯视放大示意图。9 是与电极孔 1 连接的通道，宽 $20\mu\text{m}$ ，10 是样品。2 是第一维电泳分离通道，3 是第二维电泳分离通道，箭头表示相应的电泳分离方向。在第一维电泳分离过程中可以防止样品 10 渗入第二维电泳分离通道 3，也可在第二维电泳分离过程中防止第二维电泳分离通道 3 和连接电极孔 1 的通道 9 对第一维电泳分离过程的干扰。它还可使第一维电泳分离得到的区带完整进入第二维电泳分离通道 3，而不致同时进入相邻的其他通道。图 5 是图 1 的 A—A 向纵剖视图，其

构成已如上述。

图 7 为本发明优选实施例装置所用样品的预处理过程原理示意图。11 是 PCR 聚合酶链式反应过程，12 是变性、复性过程。其中，B 代表 AGCT 中任一碱基，B' 表示该位点为 SNP 点，" + "、" - " 用以区分 DNA 的两条链。图 7 为存在 SNP 的情况，得到相同长度的 4 种 DNA 片段，有的存在错配。若不存在 SNP，则只能有一种 DNA 片段。现结合该图简要描述用本发明检测 SNP 的过程。对于可能存在 SNP 位点的待分析样品进行预处理，使得 DNA 在存在 SNP 位点的地方发生错配，具体方法见图 7。第一维电泳使不同长度的 DNA 片段得到有效分离，但是存在 SNP 位点的 DNA 和与其长度相同的 DNA 片段仍然存在于同一区带中。在第一维电泳分离时，第二维电泳分离通道两端加一定电压，防止样品扩散到第二维电泳分离通道 3 中。第二维电泳分离通道 3 是一排阵列。第一维电泳分离出的各区带通过电压控制进入第二维阵列电泳通道 3 中继续进行电泳，在这个电泳过程中，加热层在电泳前进方向提供了逐渐升高的温度梯度。有错配的 DNA 解链温度较无错配的低，在电泳前进不断升温的过程中，首先解链，从而受到更大的阻滞力，与其他尚未解链的相同长度的 DNA 片段分离。只要系统分辨率足够高，就可以把尚未解链的相同长度的 DNA 片段分离。若只分离得到 1 条区带，就可以断定无 SNP 位点，若分离得到多于一条区带，则可以断定存在 SNP。综合以上信息还可以指出 SNP 存在于哪一段 DNA 限制性片段上。

温度梯度也可以考虑在时间上实现温度梯度。在第二维电泳分离时，对电泳芯片均匀加热，控制好升温速率，可以达到与前述相同的目的。只要分离通道足够长，电泳分离效率足够高，也可用普通毛细管作一维电泳分离。分离出不同长度的 DNA 片段，然后采用时间温度梯度继续电泳。

由此可见，本申请既有毛细管电泳技术所特有的高速、高效、消耗样品少的优点，又可避免使用变性剂，使检测过程易于控制，其梯度也易于实现。

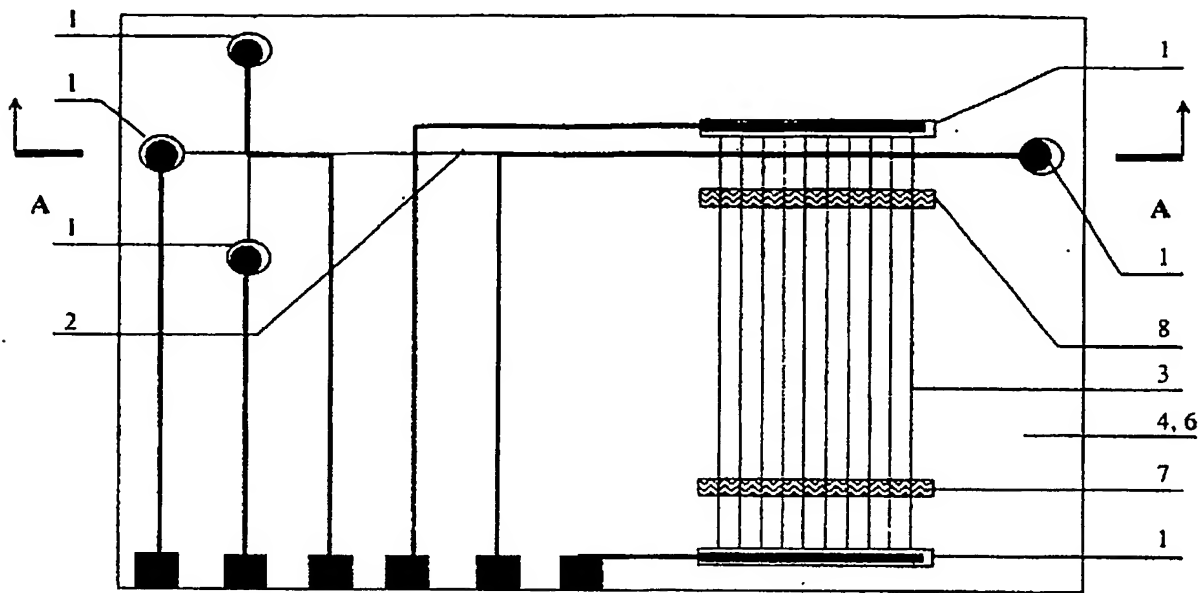


图 1

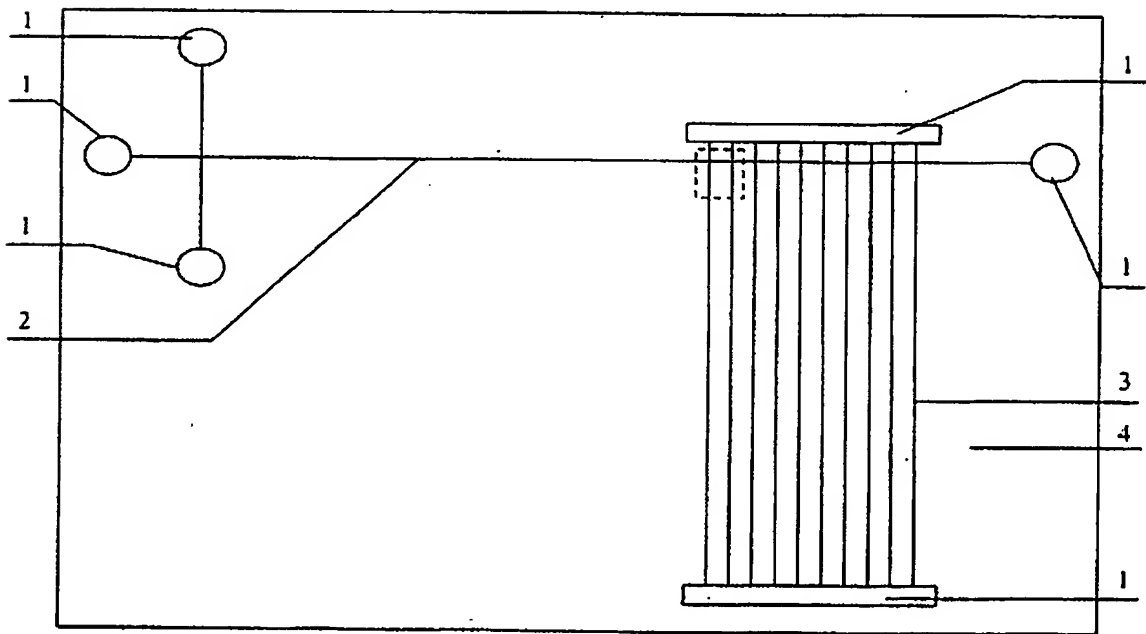


图 2

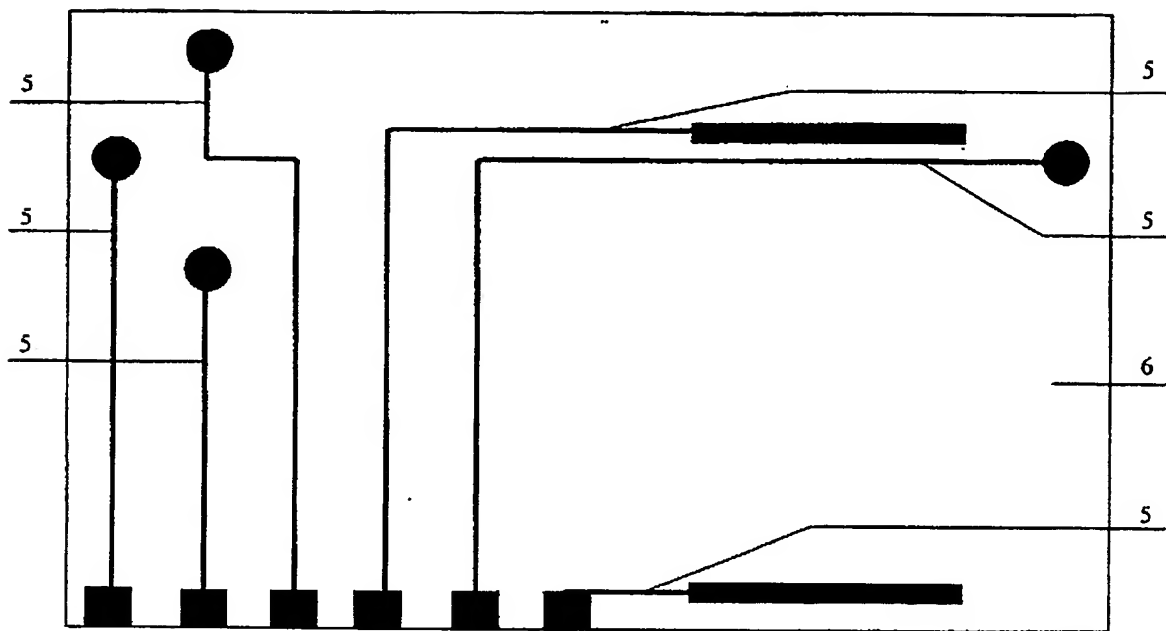


图 3

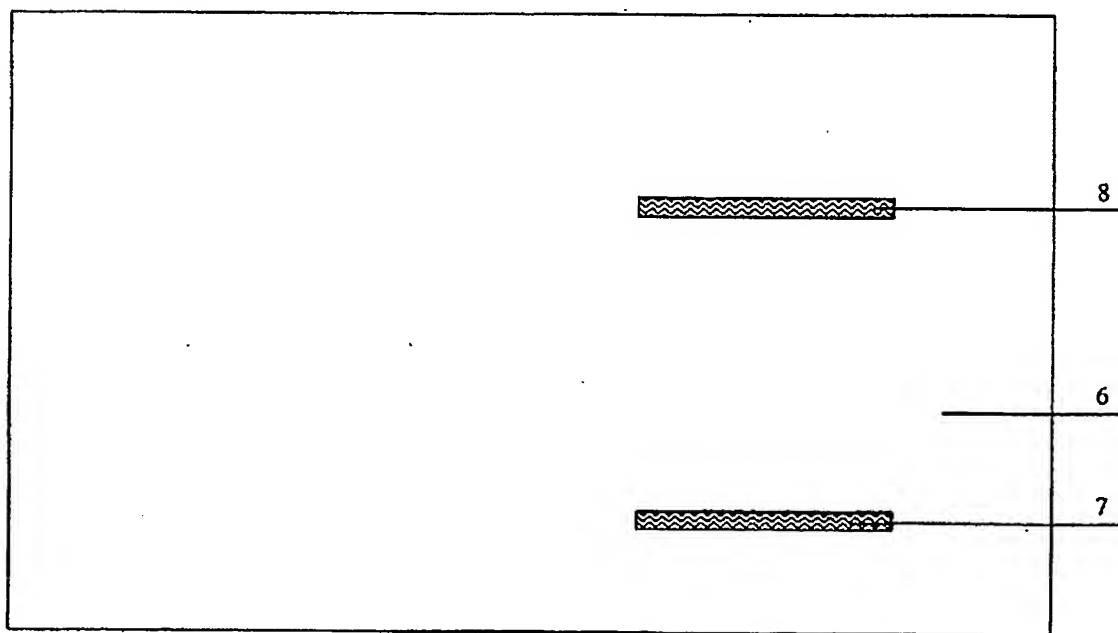


图 4

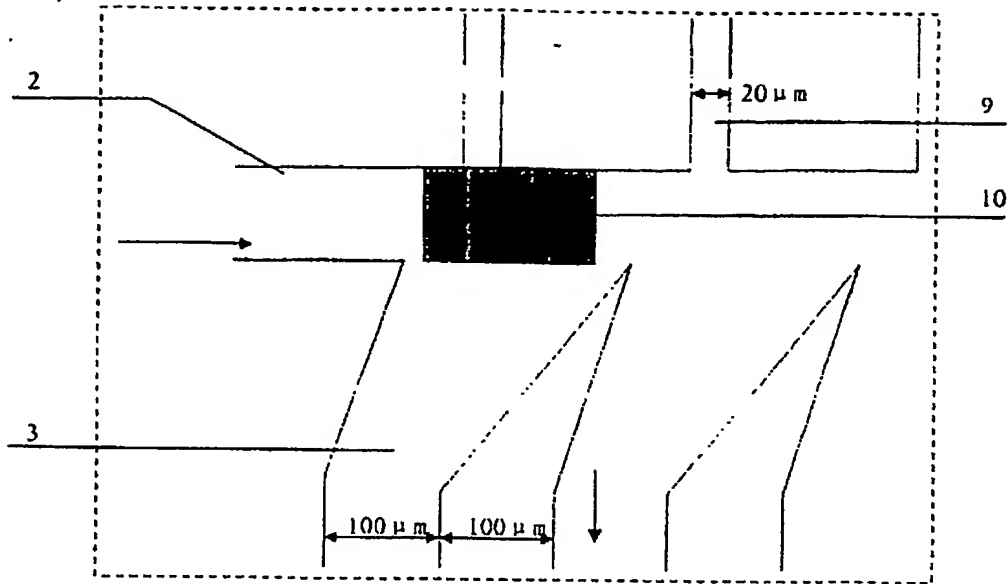


图 5



图 6

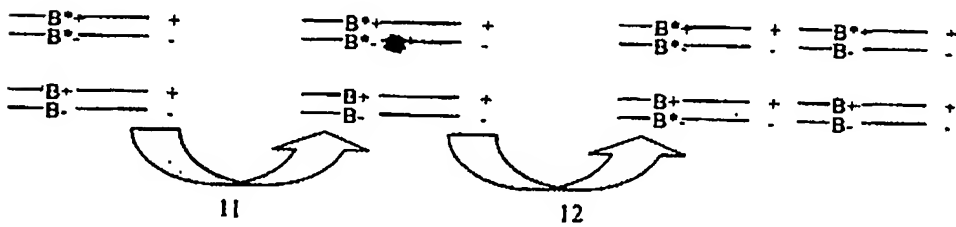


图 7